



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 198 921** ⁽¹³⁾ **C2**

(51) МПК⁷ **C 12 N 1/20, A 61 K 39/07//C
12 N 1/20, C 12 R 1:07)**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 2001106406/13, 06.03.2001

(24) Дата начала действия патента: 06.03.2001

(46) Дата публикации: 20.02.2003

(56) Ссылки: RU 2142010 C1, 27.11.1999. RU 2095409 C1, 10.11.1997. ОНИЩЕНКО Г.Г. и др. Сибирская язва: актуальные аспекты микробиологии, эпидемиологии, клиники, диагностики, лечения и профилактики. - М.: ВУНМЦ МЗ РФ, 1999, с.309-319.

(98) Адрес для переписки:
620048, г.Екатеринбург, И-48, ул. Звездная,
1, для Центра ВТП БЗ НИИМ МО РФ

(71) Заявитель:

Центр военно-технических проблем
биологической защиты
Научно-исследовательского института
микробиологии Министерства обороны
Российской Федерации

(72) Изобретатель: Орлов Ю.Н.,
Садовой Н.В., Махортова Е.Б., Федорова Н.В.

(73) Патентообладатель:

Центр военно-технических проблем
биологической защиты
Научно-исследовательского института
микробиологии Министерства обороны
Российской Федерации

**(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ НАТИВНОЙ СПОРОВОЙ СУСПЕНЗИИ ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ
СИБИРЕЯЗВЕННЫХ ВАКЦИН**

(57)

Изобретение относится к медицине, в частности к производству сибиреязвенных вакцин. Получение нативной споровой суспензии при глубинном аэробном культивировании вакцинных штаммов *B. acillus anthracis* осуществляют в два этапа: на первом этапе культивирование проводят при непрерывном перемешивании и аэрации воздухом, поддерживая температуру 30-34 °С. Когда завершается созревание

спор, осуществляют переход на второй этап, повышая температуру до 35-38 °С, и периодически кратковременно перемешивают культуральную жидкость. Способ позволяет почти до 100% повысить содержание полноценных зрелых спор в культуральной жидкости, более точно определять время завершения процесса культивирования и примерно на два часа сократить его продолжительность. 2 з.п. ф-лы, 2 табл.

RU 2 198 921 C2

RU 2 198 921 C2



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 198 921** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) Int. Cl.⁷ **C 12 N 1/20, A 61 K 39/07/(C**
12 N 1/20, C 12 R 1:07)

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 2001106406/13, 06.03.2001

(24) Effective date for property rights: 06.03.2001

(46) Date of publication: 20.02.2003

(98) Mail address:
620048, g.Ekaterinburg, I-48, ul. Zvezdnaja,
1, dlja Tsentra VTP BZ NIIM MO RF

(71) Applicant:
Tsentr voenno-tehnicheskikh problem
biologicheskoy zashchity
Nauchno-issledovatel'skogo instituta
mikrobiologii Ministerstva oborony
Rossijskoj Federatsii

(72) Inventor: Orlov Ju.N.,
Sadovoj N.V., Makhortova E.B., Fedorova N.V.

(73) Proprietor:
Tsentr voenno-tehnicheskikh problem
biologicheskoy zashchity
Nauchno-issledovatel'skogo instituta
mikrobiologii Ministerstva oborony
Rossijskoj Federatsii

(54) **METHOD OF PREPARING NATIVE SPORE SUSPENSION FOR ANTHRAX VACCINE PREPARING**

(57) Abstract:

FIELD: medicine, microbiology.
SUBSTANCE: invention relates to production of anthrax vaccines. Preparing native spore suspension in submerged aerobic culturing vaccine strains of Bacillus anthrax is carried out for two stages: at the first stage culturing is carried out at continuous stirring and aeration with air and maintaining temperature 30-34 C. After

termination of spores maturation the second stage is carried out by rise of temperature to 35-38 C and cultural fluid is stirred for short time and periodically. Method allows to increase the content of full-value matured spores in cultural liquid to almost 100%, to determine time of culturing process termination more exactly and to decrease its duration by 2 h. EFFECT: improved method of spore suspension preparing. 3 cl, 2 tbl, 2 ex

RU 2 198 921 C2

RU 2 198 921 C2

Изобретение относится к лекарственным препаратам, содержащим живые бактерии, в частности к производству сибиреязвенных вакцин, и может быть использовано в медицине и ветеринарии.

Известны способы получения нативной споровой суспензии (НСС) для приготовления живой сибиреязвенной вакцины при аэробном культивировании *B. anthracis* на плотных и жидком питательных средах /1-4/. Наиболее производительным способом получения НСС является глубинное аэробное культивирование некапсулирующих, непротеолитических и авирулентных штаммов *B. anthracis*.

Недостатком этого способа являются значительные различия в выходах полноценных нормально окрашиваемых по Цили-Нильсену спор, из-за гетерогенности в развитии популяции к концу процесса глубинного культивирования - одновременное нахождение в культуральной жидкости (ЮЖ) вегетативных клеток, проспор, незрелых спор, спор и проросших спор. Причем процентное соотношение клеток и спор, находящихся на различных стадиях развития, относительно быстро изменяется и точно определить момент завершения процесса, когда в ЮЖ находится максимальное процентное содержание полноценных спор, не всегда удается.

Прототипом изобретения служит способ получения НСС /3/ при глубинном аэробном культивировании штамма *B. anthracis* с введением добавки КУКа в период завершения накопления вегетативной биомассы.

Недостатком этого способа является относительно низкий процентный выход полноценных зрелых спор в ЮЖ.

Заявляемое изобретение направлено на повышение производительности стадии культивирования за счет синхронизации развития популяции на завершающем этапе процесса культивирования и, как следствие, к увеличению в ЮЖ процентного содержания полноценных спор.

Поставленная цель достигается тем, что предложен способ получения нативной споровой суспензии при глубинном аэробном культивировании вакцинных штаммов *B. anthracis*, отличающийся тем, что для получения полноценных спор процесс выращивания культур необходимо осуществлять в два этапа: на первом этапе, когда последовательно идет прорастание спор, накопление вегетативной биомассы и ее переход в стадию спорообразования, культивирование проводят при непрерывном перемешивании и аэрации воздухом, поддерживая температуру нативной жидкости 30-34°C, а на втором этапе, когда завершается созревание спор - в статике, повышая температуру культуральной жидкости до 35-38°C, с периодическим кратковременным перемешиванием нативной жидкости.

При этом переход с первого этапа культивирования на второй осуществляется при образовании в культуре суммарно не менее (70±10)% проспор и спор.

Для поддержания в статике заданной температуры культивирования осуществляется перемешивание ЮЖ за счет периодического включения мешалки каждые

10-15 минут на 2-3 минуты.

Указанный способ позволяет почти до 100% повысить содержание полноценных зрелых спор в ЮЖ и примерно на два часа сократить продолжительность процесса культивирования.

Пример 1. Получение НСС для приготовления живой сибиреязвенной вакцины (существующий способ).

В качестве исходной культуры для получения НСС используют эталонный вакцинный, некапсулирующий, непротеолитический сибиреязвенный штамм СТИ-1. В стерильную питательную среду на основе 1%-ного солянокислотного гидролизата рыбной муки, кукурузного экстракта с добавлением солей вводится посевной материал в количестве (3-5)·10⁵ спор на 1 мл (один из вариантов). Процесс культивирования вакцинного штамма СТИ-1 ведут при температуре 32°C, осуществляя постоянное перемешивание и аэрацию ЮЖ воздухом.

Динамика изменения цитоморфологических показателей в процессе культивирования штамма СТИ-1 при температуре 32°C и постоянном перемешивании и аэрации ЮЖ воздухом (без статики) приведена в табл. 1.

Пример 2. Получение НСС для приготовления живой сибиреязвенной вакцины (предлагаемый способ).

Начальные условия проведения процесса культивирования те же, что и в примере 1. Отличие заключается в том, что процесс культивирования осуществляется в два этапа - на первом при температуре 32°C и постоянном перемешивании и аэрации ЮЖ, а на втором - в статике при температуре 37°C.

Динамика изменения цитоморфологических показателей в процессе культивирования штамма СТИ-1 в два этапа - на первом при температуре 32°C и постоянном перемешивании и аэрации ЮЖ, а на втором - в статике при температуре 37°C приведена в табл. 2.

Как видно из данных, приведенных в табл. 1 и 2, предлагаемый способ получения НСС позволяет почти до 100% повысить содержание полноценных зрелых спор в ЮЖ, более точно определять время завершения процесса культивирования и сократить его продолжительность.

Полученная при культивировании вакцинного штамма СТИ-1 по предлагаемой технологии НСС концентрировалась, и из нее готовилась живая сибиреязвенная вакцина.

Все серии полученной вакцины удовлетворяли требованиям ГИСК им. Л.А. Тарасевича /1/.

Источники информации

1. Межреспубликанские технические условия на сибиреязвенную живую сухую вакцину для скарификационного применения (МРТУ-42 10), 1964.

2. Регламент производства сибиреязвенной живой вакцины СТИ для людей. Тбилисский НИИВС, 1958.

3. Патент 2142010. Способ глубинного культивирования сибиреязвенного вакцинного штамма СТИ-1. Заявка 97115505/13(016405) от 23.09.97 г.

4. Шенцев И.В., Шумилов Г.П., Садовой Н.В. и др. Стабильность основных свойств

живой сибиреязвенной вакцины, полученной в жидких и на плотных питательных средах - ЖМЭИ, 1981, 7. - С. 113-114.

Формула изобретения:

1. Способ получения нативной споровой суспензии при глубинном аэробном культивировании вакцинных штаммов *Bacillus anthracis*, отличающийся тем, что процесс культивирования осуществляют в два этапа: на первом этапе культивирование проводят при непрерывном перемешивании и аэрации воздухом, поддерживая температуру 30-34 °С, а когда завершается созревание спор, осуществляют переход на второй этап,

при этом повышают температуру культуральной жидкости до 35-38°С и периодически кратковременно перемешивают культуральную жидкость.

5

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что переход с первого этапа культивирования на второй осуществляется при образовании в культуре суммарно не менее (70±10)% преспор и спор.

10

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что на втором этапе перемешивание культуральной жидкости осуществляется за счет периодического включения мешалки каждые 10-15 мин на 2-3 мин.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

RU 2 1 9 8 9 2 1 C 2

RU 2 1 9 8 9 2 1 C 2

Т а б л и ц а 1

Динамика изменения цитоморфологических показателей в процессе культивирования штамма СТИ-1 при температуре 32°C в постоянном перемешивании и аэрации ЮЖ воздухом (без статики)

| Наименование показателя | Значение показателя (в %) при продолжительности культивирования..., ч | | | | | | | | |
|-------------------------|---|-----|----|----|----|----|-------|-------|----|
| | 24 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 |
| 1. Вегетативные клетки | 99 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | ед. | 1-5 | 5 |
| 2. Проспору | 1 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3. Незрелые споры | 0 | 0 | 99 | 95 | 90 | 85 | 20-30 | 20-25 | 20 |
| 4. Зрелые споры | 0 | 0 | 1 | 5 | 10 | 15 | 70-80 | 65-75 | 70 |
| 5. Проросшие споры | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | ед. | 1-5 | 5 |

Т а б л и ц а 2

Динамика изменения цитоморфологических показателей в процессе культивирования штамма СТИ-1 в два этапа - на первом при температуре 32°C и постоянном перемешивании и аэрации ЮЖ, а на втором в статике при температуре 37°C

| Наименование показателя | Значение показателя (в %) при продолжительности культивирования..., ч | | | | | | |
|-------------------------|---|----|--------------------------|----|----|-------|-------|
| | 24 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 |
| | | | в том числе в статике, ч | | | | |
| | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 1. Вегетативные клетки | 95 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2. Проспору | 5 | 99 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3. Незрелые споры | ед. | 1 | 95 | 90 | 85 | 70-80 | 2-5 |
| 4. Зрелые споры | 0 | 0 | 5 | 10 | 15 | 20-30 | 95-98 |
| 5. Проросшие споры | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

RU 2198921 C2

RU 2198921 C2

THIS PAGE LEFT BLANK